

· 基础研究 ·

分米波对大鼠再生神经 NGF mRNA 表达的影响

田德虎 张英泽 赵峰 米立新 张继春 韩久卉

【摘要】目的 研究分米波对周围神经损伤后再生神经中神经生长因子(NGF)表达的影响。**方法** 选用 60 只 SD 大鼠,随机分为实验组和对照组各 30 只,均于右侧坐骨神经中段切除 5 mm 神经组织,硅胶管桥接神经缺损,形成神经再生室,实验组术后进行局部分米波辐射。于术后 1,2,4 和 8 周取材,行大体和光镜观察,并进行免疫组化检测及 RT-PCR 定量分析。**结果** 实验组 NGF 阳性染色颗粒及积分光密度值(OD)明显高于对照组。实验组各时间点再生神经纤维中 NGF mRNA 的含量均明显高于对照组($P < 0.01$),同一神经纤维中 NGF mRNA 表达量近侧明显高于远侧($P < 0.05$)。实验组再生神经纤维中 NGF mRNA 于术后 1 周即有表达,术后 2~4 周达到高峰,术后 8 周后开始下降。**结论** 分米波能增加神经纤维中 NGF mRNA 的表达,促进周围神经再生。

【关键词】 分米波; 神经生长因子; 周围神经损伤; 神经再生; 免疫组织化学; 反转录聚合酶链反应

Effect of decimeter wave on the expression of NGF mRNA in regenerated nerve TIAN De-hu*, ZHANG Ying-ze, ZHAO Feng, MI Li-xin, ZHANG Ji-chun, HAN Jiu-hui. * Department of Hand Surgery, the 3rd Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of decimeter wave on the expression of nerve growth factor (NGF) in regenerated nerve after peripheral nerve injury. **Methods** Sciatic nerve in the middle right legs of 60 SD rats was resected for 5mm, and the two cut ends were bridged by a silicone tube which served as a nerve regeneration chamber. The experimental group was treated by decimeter wave after operation. The bridged nerves were sampled at the 1st,2nd,4th,8th week, respectively after operation and the samples were observed by light microscope, histochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** In decimeter wave sides, the expression of immunologic reaction to NGF and integration optical density were higher than those of the control sides. In regenerated nerves, the level of NGF mRNA in decimeter wave sides was higher than that in the control sides ($P < 0.01$). In regenerated nerves, the level of NGF mRNA in the proximal stump was higher than that in distal stump ($P < 0.05$). In decimeter wave sides, NGF mRNA appeared at the 1st week after operation. During the treatment period, the level of NGF mRNA was gradually increased and peaked at 2~4 weeks after operation and then began to decrease at the 8th week after operation. **Conclusion** Decimeter wave could increase the expression of NGF mRNA in regenerated nerves and promote regeneration of peripheral nerve.

【Key words】 Decimeter wave; Nerve growth factor; Peripheral nerve injury; Nerve regeneration; Immunohistochemistry; Reverse transcription polymerase chain reaction

周围神经损伤后的神经功能恢复一直是很棘手的世界性医学难题^[1]。随着显微外科技术的不断提高和实验手段的不断进步,对此类研究越来越多。近年来发现神经再生过程需要多种神经营养因子(neurotrophic factor, NTF)的参与,如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、睫状神经营养因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、胶质细胞系源性神经营养因子(glial cellline-derived neurotrophic factor,

GDNF)等^[2-4]。物理因子如电刺激、毫米波及调制中频脉冲电可促进神经再生^[5-8]。为此我们设计了本实验,试图通过对大鼠坐骨神经硅胶管再生室模型进行分米波辐射治疗,应用 RT-PCR 技术检测再生神经纤维中 NGF mRNA 的表达水平,以探讨分米波促进周围神经再生的分子机制,为其临床应用提供理论依据。

材料与方法

一、手术方法及动物分组

选取体重 200~250 g 成年雄性 SD 大鼠 60 只(河北医科大学动物实验中心提供)。1% 戊巴比妥钠

作者单位:050051 石家庄,河北医科大学第三医院手外科(田德虎、赵峰、张继春、韩久卉),创伤急救中心(张英泽),康复科(米立新)

(30 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,常规备皮,消毒。于右侧大腿后部正中切口,显露坐骨神经,于梨状肌下缘 10 mm 处切除 5 mm 长的一段神经,两断端任其回缩。在 8 倍手术显微镜下以 9-0 无创线将神经两断端分别套入长 10 mm 的硅胶管中(外径 2.0 mm,内径 1.5 mm),神经两断端间距 6 mm。术后随机分成实验组和对照组,每组 30 只。实验组于术后第 1 天至术后 8 周取俯卧、双腿伸直位固定于实验台上,大腿后正中行分米波辐射。分米波治疗仪采用国产 TMA-A 型双频微热疗机(河北医科大学第三医院康复科提供),频率为 915 MHz,功率 5 W,辐射距离 10 cm,1 次/d,10 min/次,每周连续治疗 5 d,休息 2 d。对照组于实验组治疗同时逐一在微热疗机旁应用同型实验台固定 10 min,进行空白对照。

二、检测项目和方法

(一)大体检查和光镜检查

分别于术后 1,2,4 和 8 周暴露桥接神经处以便进行观察。在两吻合口近、远侧 2 mm 处及再生神经中段各取 2 mm 长的神经段,中性福尔马林固定,HE 染色,显微镜下观察再生神经横切面结构。

(二)免疫组化检测

分别于术后 1,2,4 和 8 周取材,标本制成 5 μ m 的石蜡切片,兔抗鼠 NGF(1:100)(武汉博士德生物工程有限公司提供)ABC 法常规程序进行免疫组织化学染色,显微镜下观察切片中组织染色以及 NGF 在神经中的蛋白表达。

(三)定量 RT-PCR 分析

试剂:AMV 反转录酶、Rnasin、Taq DNA Polymerase、dNTPs Kit、Random primer Kit 和异硫氰酸胍及琼脂糖均为 Promega 公司产品;NGF 引物(Gene Bank: M17297)由上海生物工程公司合成,扩增产物为 259 bp; primer 1: 5'-GAACGAATGAAGCACCTA-3'; primer 2: 5'-TTCCAACAAAGCCAACTC-3'; GAPDH 引物由上海生物工程公司合成,扩增产物为 606 bp; primer 3: 5'-CCCACGGCAAGTTCAACGGCA-3'; primer 4: 5'-TGCCAGGTTTCTCCAGCGGCG-3'。

分别于术后 1,2,4 和 8 周取材,用异硫氰酸胍一步法提取神经组织中总 RNA。按一定顺序加入反转录试剂和样品,混匀,置 42℃ 水浴 30 min,95℃ 水浴 5 min,以灭活反转录酶,置 -20℃ 环境下备用。PCR 反应过程为 95℃ 1 min; 94℃ 1 min, 51℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 次循环;最后 72℃ 延伸 6 min。反应产物 10 μ l 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下分析结果并照相。记录 PCR 产物电泳照片的条带灰度和像素,计算各个样品中 NGF mRNA 相对于内参 GAPDH mRNA 的表达水平,即 $R = (\text{NGF 灰度} \times \text{像素}) /$

$(\text{GAPDH 灰度} \times \text{像素})$ 。

三、统计学分析

实验结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,数据间比较采用 t 检验。

结 果

一、大体观察

术后 1 周,两组均有皮下组织和神经周围组织充血、水肿,实验组与对照组相比充血、水肿较轻,实验组神经周围无粘连或少许薄膜粘连;对照组则多见由新鲜肉芽组织形成的粘连。术后 2 周,两组神经周围组织充血、水肿均明显减轻,实验组神经周围多为薄膜或较疏松的粘连;对照组神经周围广泛疏松粘连,钝性易分离。两组硅胶管外均有一层完整结缔组织膜,实验组硅胶管内两神经断端已被再生神经桥接起来;对照组两断端间仍有距离。术后 4 周,两组神经周围组织充血、水肿基本消退。实验组神经周围多为较疏松的粘连;而对照组神经周围广泛致密的粘连,钝性不易分离。硅胶管外结缔组织膜较厚,两组硅胶管内均有再生神经干通过。术后 8 周,两组神经周围组织无充血、水肿。再生神经干较术后 4 周时明显增粗。神经周围粘连情况与术后 4 周基本相同。

二、光镜观察

术后 2 周,对照组神经断端及神经周围有较多炎性细胞浸润,并可见散在多核巨细胞;实验组炎性细胞局限于神经外膜浅层,再生神经中段可见再生轴突,但未越过远侧吻合口。术后 4 周,两组炎性反应均明显减轻,实验组神经内很少见到炎性细胞,神经周围粘连局限、疏松;对照组神经内仍可见少许炎性细胞聚集,周围组织粘连致密。两组轴突均已越过远侧吻合口进入远段神经内,实验组有较多再生轴突及髓鞘形成,有神经束结构形成;对照组轴突排列较稀疏,神经束状结构不明显。术后 8 周,实验组神经周围组织粘连疏松;对照组粘连紧密。两组再生神经干内部结构已比较成熟,束状结构明显,有大量轴突和髓鞘形成。但实验组再生神经纤维密集,直径粗大,分布均匀;对照组神经纤维排列较稀疏,分布不均匀,粗细不一(图 1,2)。

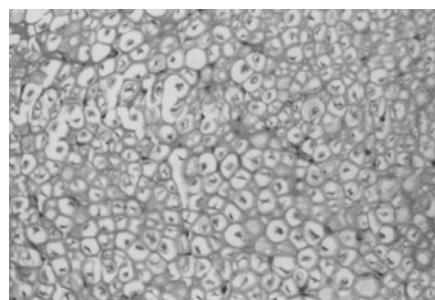


图 1 术后 8 周实验组光镜结果(HE 染色, $\times 400$)

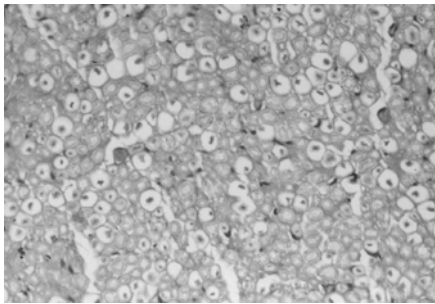


图2 术后8周对照组光镜结果(HE染色, ×400)

三、免疫组化检测

1. 神经断端近侧: 术后3 d, 两组神经近侧远部阳性染色颗粒均减少, 其分布与正常时相同; 术后1~2周, 实验组断端神经近侧包绕再生神经纤维的雪旺细胞中, 能见到较明显的阳性染色颗粒, 对照组则偶见; 术后4周, 实验组再生神经纤维周围围绕近似正常的雪旺细胞, 其中阳性染色颗粒与正常时相似, 对照组明显低于正常时(图3, 4)。

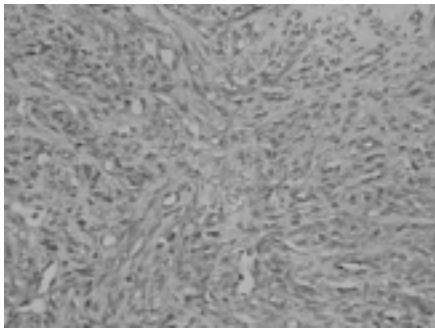


图3 术后4周实验组神经近侧 NGF 分布情况(HE染色, ×400)

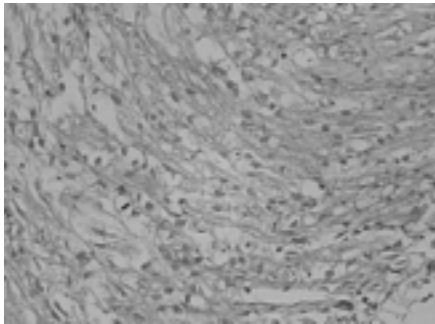


图4 术后4周对照组神经近侧 NGF 分布情况(HE染色, ×400)

2. 神经断端远侧: 术后3 d, 两组横断神经远段, 轴

索几乎消失, 缺乏正常及成熟的雪旺细胞, 阳性染色颗粒明显减少; 术后1周, 实验组远侧段仅见少量的雪旺细胞中存在阳性染色颗粒, 对照组未见; 术后2~4周, 两组均未见阳性染色颗粒, 此时缺乏正常的雪旺细胞, 代之以大量的类纤维细胞和未成熟雪旺细胞构成的Bungner带。

四、定量 RT-PCR 分析

PCR 分析结果见图5、图6及表1。从图5、图6及表1可知, 神经纤维中 NGF mRNA 含量在同一时间点实验组明显高于对照组 ($P < 0.01$); 同一神经纤维中 NGF 表达量近侧明显高于远侧 ($P < 0.05$)。实验组 NGF mRNA 含量在术后1周即有表达, 术后2周~4周内表达量增高, 术后8周后表达量明显下降。

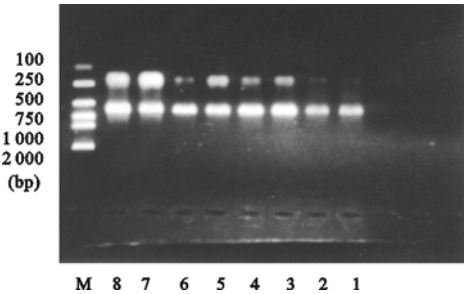


图5 两组术后1周和2周的 PCR 分析

注: “M”为 marker; “1”为1周时对照组近侧; “2”为1周时对照组远侧; “3”为1周时实验组近侧; “4”为1周时实验组远侧; “5”为2周时对照组近侧; “6”为2周时对照组远侧; “7”为2周时实验组近侧; “8”为2周时实验组远侧

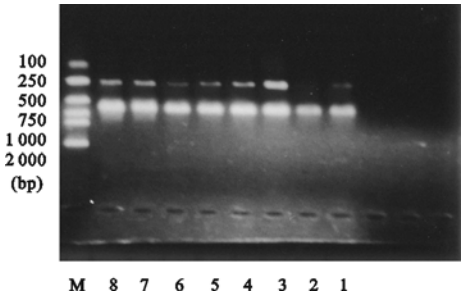


图6 两组术后4周和8周的 PCR 分析

注: “M”为 marker; “1”为4周时对照组近侧; “2”为4周时对照组远侧; “3”为4周时实验组近侧; “4”为4周时实验组远侧; “5”为8周时对照组近侧; “6”为8周时对照组远侧; “7”为8周时实验组近侧; “8”为8周时实验组远侧

表1 两组再生神经纤维中 NGF mRNA 的相对表达量比较

神经部位	1 周	2 周	4 周	8 周
实验组近侧	0.486 9 ± 0.009 7 * [△]	1.182 7 ± 0.020 4 * [△]	0.433 0 ± 0.011 3 * [△]	0.269 9 ± 0.009 4 [△]
实验组远侧	0.388 7 ± 0.015 2 *	0.879 3 ± 0.019 3 *	0.251 6 ± 0.008 6 *	0.224 3 ± 0.012 3 *
对照组近侧	0.287 9 ± 0.012 7	0.625 7 ± 0.010 5	0.287 7 ± 0.007 9	0.267 1 ± 0.015 7
对照组远侧	0.286 1 ± 0.017 5	0.327 9 ± 0.009 9	0.173 2 ± 0.010 1	0.237 1 ± 0.020 1

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与本组远侧比较, [△] $P < 0.05$

讨 论

周围神经损伤后局部充血、水肿,与周围组织形成广泛而致密的粘连,导致在损伤的基础上又形成卡压;而卡压又会加重神经充血、水肿,使再生神经缺血、缺氧,这一恶性循环阻碍了神经再生。促进周围神经再生的各种康复措施均通过改善损伤局部的血液循环、增加损伤局部的营养代谢来发挥促进神经再生的作用。本实验结果显示,术后 1 周,两组均有皮下组织和神经周围组织充血、水肿,实验组轻于对照组;术后 2 周,实验组炎性细胞局限于神经外膜浅层,对照组神经断端及神经周围有较多的炎性细胞浸润,并可见散在的多核巨细胞;术后 4 周,实验组神经周围多为较疏松的粘连,对照组神经周围出现广泛致密的粘连,钝性不易分离。实验组神经内很少见到炎性细胞,神经周围粘连局限、疏松,对照组神经内仍可见少许炎性细胞聚集,周围组织粘连致密。这充分说明分米波能有效抑制损伤后的炎性反应、改善损伤局部血液循环,减少瘢痕形成,减轻损伤神经粘连,利于神经再生^[9]。

神经再生需要一个适宜的微环境,雪旺细胞是神经再生微环境中十分重要的因素^[10],是神经元存活及轴突生长的重要条件之一。雪旺细胞是一种神经胶质细胞,包绕神经轴突形成或不形成髓鞘。正常成年动物的雪旺细胞呈相对静止状态,神经损伤后,损伤神经段发生瓦勒变性脱髓鞘,雪旺细胞功能发生改变,从维持髓鞘结构及轴突完整的结构细胞转变为再生支持细胞。NGF 是神经系统最重要的生物活性分子之一,对神经元的发育、分化、维持正常功能及防止神经元胞体在神经损伤后发生退变死亡具有极其重要的作用^[11]。NGF 是一种分子量为 26 kDa 的多肽,在周围神经系统中主要来源于雪旺细胞。故当雪旺细胞增殖活跃时,NGF 的表达水平必将随之升高。因此,在周围神经系统中如检测到 NGF 表达水平升高,则提示该处雪旺细胞增殖活跃。在促进神经再生的各种措施中,如能使雪旺细胞增殖活跃,即可说明该措施有促进神经再生的作用。

本实验免疫组化结果显示,术后 1 周,实验组断端神经近侧的雪旺细胞中可见较明显的阳性染色颗粒,对照组则偶见;实验组远侧段仅见少量雪旺细胞中存在阳性染色颗粒,对照组未见;术后 2~4 周,实验组断端神经近侧再生神经纤维周围围绕着近于正常的雪旺细胞,其中的阳性染色颗粒与正常时相似,对照组明显

低于正常时。定量 RT-PCR 分析结果显示,各组神经纤维中 NGF mRNA 的含量在相同时间点实验组明显高于对照组;同一部位神经纤维中 NGF mRNA 表达量近侧明显高于远侧。实验组 NGF mRNA 在术后 1 周即有表达,2~4 周内表达量增高,8 周后表达量明显下降。以上结果表明,分米波可通过提高神经组织中 NGF 水平,使逆转运速度加快,从而减轻神经断端轴突变性反应,促进损伤轴突对 NGF 的摄取,加速轴突逆行运输 NGF 的过程,进而保护脊髓前角运动神经元,减少细胞凋亡,促进轴突再生和髓鞘化;同时也提示分米波可促进雪旺细胞分裂增殖,提高 NGF 的表达水平,进而促进周围神经再生。但由于术后 8 周再生神经纤维中 NGF mRNA 的表达开始下降,应补充外源性 NGF,以维持 NGF 的最佳水平,促进神经再生。术后 8 周再生神经纤维中 NGF mRNA 的表达开始下降是否由于对分米波辐射产生了适应性,有待于进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 李剑,姜保国. 神经管桥在周围神经损伤修复中的应用. 中华实验外科杂志, 2003, 20:1161-1162.
- 2 郑宏良,由振东,周水森,等. CNTF 在周围神经损伤及再生中的表达和分布. 第二军医大学学报, 2002, 23: 605-608.
- 3 李陶,陈意生,王禾. 睫状神经营养因子、雪旺氏细胞与周围神经再生. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2001, 22: 25-26.
- 4 陈哲宇,李建红,郑兴东,等. 胶质细胞源性神经营养因子对周围神经再生的作用. 中国实用手外科杂志, 2001, 15: 26-29.
- 5 米立新,王彦香,张仲,等. 经皮电神经刺激对周围神经再生的影响. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 209-211.
- 6 尹爱莉,祝玮. 应用正弦调制中频电疗及微波治疗 DPN. 辽宁实用糖尿病杂志, 2003, 11: 27-28.
- 7 田德虎,郭明珂,米立新,等. 分米波防治屈肌腱粘连机制的实验研究. 中华物理医学与康复杂志, 2003, 25: 646-649.
- 8 张开刚,冷启新. 周围神经损伤再生微环境的研究进展. 解剖科学进展, 2002, 8: 92-94.
- 9 Dubovy P, Svizenska I, Klusakova I, et al. Laminin molecules in freeze-treated nerve segments are associated with migrating Schwann cells that display the corresponding alpha6beta1 integrin receptor. Glia, 2001, 33:36-44.
- 10 楚燕飞,朱刚,陈著,等. 大鼠坐骨神经损伤后雪旺细胞、层粘连蛋白动态变化研究. 创伤外科杂志, 2002, 4: 270-273.
- 11 Whitworth IH, Brown RA, Dore CJ, et al. Nerve growth factor enhances nerve regeneration through fibronectin grafts. J Hand Surg, 1996, 21: 514-522.

(修回日期:2004-06-20)

(本文编辑:熊芝兰)

欢迎订阅《中华物理医学与康复杂志》